

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-247895

(P2000-247895A)

(43) 公開日 平成12年9月12日 (2000.9.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 35/74		A 6 1 K 35/74	A 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 B 0 6 5
A 6 1 P 29/00		A 6 1 K 31/00	6 2 9 A 4 C 0 8 7
37/02			6 3 7 B
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
		審査請求 有	請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-47532

(22) 出願日 平成11年2月25日 (1999.2.25)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72) 発明者 伊藤 敏敏

仙台市泉区将監2-20-7

(72) 発明者 植村 順子

仙台市太白区長町8-6-10 東北大学長  
町宿舍2-210

(72) 発明者 狩野 宏

東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業  
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患予防組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 慢性関節リウマチ等自己免疫疾患の予防効果を有するリン含有多糖類生産能を有する乳酸菌（例えば、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1）を有効成分とする自己免疫疾患予防/治療用組成物。

【効果】 該乳酸菌自体又はそれを用いて調製した酸乳等発酵乳タイプの本組成物は、特に自己免疫疾患予防用組成物として長期間摂取するのに適している。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 自己免疫疾患予防作用を有し、ガラクトースとグルコースを構成糖とし且つリンを含有する多糖類生産性を有する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする自己免疫疾患予防組成物。

【請求項2】 乳酸菌がラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) OLL1073 R-1であること、を特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 乳酸菌含有物が、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物、乳酸菌培養液、乳酸菌発酵乳から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】 処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつ）、希釈物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】 組成物が飲食品タイプ又は医薬品タイプの組成物であること、を特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 (FERM P-17227)。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自己免疫疾患予防効果を有する乳酸菌および該乳酸菌を含有する組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 免疫細胞は生体防御において中心的な役割を果たしている。しかし、近年、アレルギーや自己免疫疾患等で見られるように、免疫系における制御の破綻を原因とする疾患が著しく増加している。アレルギーは本来生体にとって無害な抗原に対して生体側の免疫細胞が過剰に反応してしまうために生じる疾病である。自己免疫疾患は免疫細胞が生体自身の組織や成分などに反応するために生じる疾病である。自己免疫疾患はその発症、および慢性化に自己免疫反応が関与しているため、潰瘍性大腸炎や慢性関節リウマチの一部など自己免疫疾患として知られている疾病について、いずれにおいても対症療法はあるが予防法は無論、完治法は未だ確立していない。

【0003】 前述のとおり、自己免疫疾患の慢性化には免疫系における制御の破綻が大きく関与しており、特に、Th1型のサイトカインを産生するT細胞が関与している。生体免疫系において、ヘルパーT細胞には、1型ヘルパーT細胞(Th1)と2型ヘルパーT細胞(Th2)とが存在する。これらの内、Th1細胞は、IL

-2、IFN- $\gamma$ を産生し、IgG2aの産生を誘導し、遅延型過敏反応を高める。それに対し、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-6、IL-10を産生し、IgE、IgG1の産生を誘導する。生産されたこれらのサイトカインは相互に作用し合って、免疫、アレルギー反応を調節する。健康な生体内ではTh1とTh2の均衡が保たれているが、アレルギーが引き起こされる場合はTh2が優勢であり、逆に、自己免疫疾患ではTh1が優勢となっていることが知られている。

【0004】 自己免疫疾患の一種である慢性関節リウマチにおいても、Th1タイプのサイトカインの関与が示唆されており、動物実験モデルにおいてTh1サイトカインの一つであるIFN- $\gamma$ を中和あるいはTh2サイトカインの一種であるIL-4を投与することにより関節炎の抑制、または軽減化が確認されている。しかし、Th1タイプの免疫応答は各種病原菌、および腫瘍の排除において重要な役割を果たすため、過剰なTh2へのシフトはアレルギーの原因となるだけではなく、病原菌やウイルスによる感染、および腫瘍に対する抵抗性の低下へとつながる。また、Th2タイプのサイトカインや免疫抑制剤の投与はその副作用だけではなく、コストの面でも問題があり、長期間の療養を必要とすることが多い自己免疫疾患患者への負担は大きい。そこで慢性関節リウマチの治療および予防には極端なTh2応答へのシフトなどの副作用がなく、なおかつ日常的に摂取できるような薬品または食品の開発が求められている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 前述のような理由から、本発明は慢性関節リウマチ等の予防手段として、安価で日常的に摂取が可能であり、なおかつ安全な、つまり、Th1応答の過剰な抑制による弊害のない食品、あるいは医薬品の提供を目的としている。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、上記した問題点を解決するためになされたものであり、慢性関節リウマチの動物実験モデル(Collagen-Induced Arthritis; CIA)に対する乳酸菌の抑制効果につき鋭意研究を重ねた結果、乳酸菌のうち、多糖類産生能を有する*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1を見出した。該菌の発酵物をマウスに経口投与することによりCIAの発症が抑制され、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化される、という重要な知見が得られた。また、該菌は慢性関節リウマチの他に、潰瘍性大腸炎など他の炎症性疾患に対する抑制効果を有するものと期待される。*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1の菌学的性質は以下の通りである。

## 【0007】 A. 形態的性状

細胞の形：桿菌

運動性：なし

胞子の有無：なし

グラム染色性：陽性

【0008】B. 培地上の生育状態

BL寒天培地（栄研化学）平板上で該菌株を塗布し、スチールワール法により37℃、48時間培養して、不透明なラフ型コロニーの形態を示す。

【0009】C. 生理学的性状

硝酸塩の還元：陰性

インドール生成：陰性

ゼラチン液化：陰性

カタラーゼ：陰性

酸素に対する態度：通性嫌気性

グルコースよりホモ乳酸発酵によりD（-）乳酸を生成し、ガスを産生しないBL液体培地で10℃での生育は陰性、45℃での生育は陽性

アルギニン分解性：陰性

リンゴ酸からのガス産生：陰性

各種炭水化物の分解性（陽性+、陰性-）

アラビノース -

キシロース -

ラムノース -

リボース -

グルコース +

マンノース +

フルクトース +

ガラクトース -

シュクロース -

マルトース -

セロビオース -

ラクトース +

トレハロース -

メリビオース -

ラフィノース -

メレチトース -

デキストリン -

デンプン -

グリコーゲン -

イヌリン -

マンニトール -

ソルビトール -

イノシトール -

エスクリン -

サリシン -

【0010】D. 遺伝学的特性

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1をTannockらの方法 (Microbial. Ecol. Health Dis. 8:79-84(1995), Appl. Environ. Microbiol. 62:4608-4613(1996)) に準じて、培養後に菌体をアガロースプラグに固定し、溶菌後、ゲノムDNAを制限酵素 (ApaI) で分解してパルスフィールド電気泳動を行ったところ、図1のバンドパターンを示した。図中、Aはサイズマーカー、Bは*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1を示す。

【0011】E. 多糖類生産性

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1（以下、本菌株ということもある）は多糖類生産性を有し、ガラクトースとグルコースを構成糖としリンを含有する多糖類を細胞外へ生産するという特徴を有する。

【0012】すなわち、本菌株を10%脱脂粉乳培地で37℃、24時間インキュベートした後の培養物1Lについて、エタノール沈澱、ヌクレアーゼ及びプロテナーゼ処理した後、凍結乾燥し、多糖類58.4mgを得た。この多糖類について、DEAE-TOYOPEARL 650Mを用いるイオン交換樹脂処理を行い、樹脂に吸着しない中性多糖類 (NPS) と樹脂に吸着する酸性多糖類 (APS) の2つのフラクションを、それぞれ、4.26mg/l及び2.18mg/l得た。

【0013】多糖類の分子量については、NPSが $1.2 \times 10^6$  Da、APSが $1.1 \times 10^6$  Daと推定された。また、ピリジルアミノ化による糖組成分析の結果、NPS及びAPSともにガラクトース (Gal) とグルコース (Glc) の比は、1.3:1.0であり、ラムノースは含まれていなかった。過塩素酸加水分解後、モリブデン酸アンモニウムを用いるリンの定量法によるリンの含有量は、APSがリンを0.1%含有していたのに対し、NPSにはリンは含まれていなかった。これらの分析結果を表1に示す。

【0014】

(表1: 糖及びリンの含有量)

	含有量 (%)		モル比	
	全炭水化物	リン	Glc	Gal
NPS	68.1	0.0	1.0	1.3
APS	73.6	0.1	1.0	1.3

【0015】メチル化による分析の結果、NPSは、3Gal及び2Glcのくり返し単位を有する5糖類から

なるものであった。その結果を表2に示す。なお、2,3,4,6-Tetra-O-Me-Galを1.0とした。

【0016】

(表2: NPSのメチル化分析)

	モル比
2, 3, 4, 6-Tetra-O-Me-Gal	1.0
2, 3, 6-Tri-O-Me-Gal	0.7
3, 4, 6-Tri-O-Me-Glc	0.8
2, 4, 6-Tri-O-Me-Glc	1.3
2, 6-Di-O-Me-Gal	0.9

【0017】本菌株は、一般的菌学的性質からみて、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* に属するものと認められるが、特に、多糖類生産性を有する点、その多糖類にはリンが含まれている点、そのうえ自己免疫疾患予防作用という新規にして有用な生理活性を有する点において特徴的であり、このような菌株は過去に報告された例がないことに鑑み、本菌株を新規菌株と認め、これを *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 と命名して、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-17227 として寄託した。

【0018】該乳酸菌は、後記する実施例からも明らかに、CIAの発症を低減させ、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化されることが確認され、この有用新知見に基づき本発明は完成されたものであって、本発明は、自己免疫疾患予防作用を有し、Gal、Glc、リン含有多糖類生産性を有する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなることを特徴とする自己免疫疾患予防組成物に関するものである。

【0019】乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液；乳酸菌培養物（菌体、培養上清液、培地成分を含む）；乳酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液；乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳；等が挙げられる。

【0020】処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳の濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、希釈物等が挙げられる。また、乳酸菌としては、生菌体、湿潤菌、乾燥菌、死菌体、菌体破碎物等が適宜使用可能である。

【0021】本発明に係る組成物は、乳酸菌、含有物、処理物の少なくともひとつを有効成分として含有してなるものであって、飲食品タイプ及び医薬品タイプのいずれのタイプの組成物としても自由に使用できるものである。

【0022】有効成分の配合量は、任意でよいが、使用目的（予防、保健、又は治療）、患者の年齢、投与方法、剤形等に応じて適宜定めればよく、通常、0.00

01～10%の範囲が適当である。しかしながら、長期間に亘って保健上ないし健康維持の目的で摂取する場合には、上記範囲よりも少量であってもよいし、また本有効成分は、安全性について問題がないので、上記範囲よりも多量に使用しても一向にさしつかえない。現にマウスを用いた10日間の急性毒性試験の結果、1000mg/kgの経口投与でも死亡例は認められなかった。

【0023】飲食品タイプの組成物として使用する場合には、本有効成分をそのまま、使用したり、他の食品ないし食品成分と併用したりして適宜常法にしたがって使用できる。本有効成分を用いる本発明に係る組成物は、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよいが、甘味料、酸味料、ビタミン剤その他ドリンク剤製造に常用される各種成分を用いて、健康ドリンクに製剤化すると好適である。

【0024】医薬品タイプの組成物として使用する場合、本有効成分は、種々の形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して、1日当り、静脈投与の場合は、体重1kg当り、菌体  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$  cfu を投与することができ、筋肉投与の場合は  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  cfu を投与することができる。また、経口投与の場合には  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  cfu 程度投与すればよいが、本菌は本来食用として用いられるものであるので安全性に問題はなく、上記範囲よりも高濃度の投与も可能である。

【0025】該乳酸菌はCIAの発症率を低減させ、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化される。次に、該菌株の発酵乳への利用につき、実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。例えば *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 株を用いた発酵乳を製造する際は、該菌株を単独スターターとして利用する方法、該菌株ならびに該菌株と共生作用を有する *Streptococcus thermophilus* 株との混合スターターとして利用する方法、もしくは、その他の乳酸菌 (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) や *Bifidobacterium* との混合スターターとして利用する方法が実施可能である。

【0026】本発明に係る組成物は、上記のように医薬品タイプ、飲食品タイプの組成物とすることができ、特に後者においては、発酵乳、酸乳、乳酸菌飲料、ヨーグルト等の形態に調製することができ、これ（ら）を日常的に摂取することにより、知らず知らずの内に無理なく慢性関節リウマチその他各種の自己免疫疾患を予防、軽

減、治療することができる。しかも、本組成物は安全性にも問題がないので、有害な副作用を伴うことなく長期間摂取することができ、自己免疫疾患の予防に極めて好適であり、すぐれた特定保健用食品ということが出来る。以下、本発明の実施例について述べる。

#### 【0027】

【実施例1】*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株を10% (w/w) 脱脂粉乳培地で約18時間培養後、得られた培養液を凍結乾燥処理した。本処理により得られた凍結乾燥粉末をマウス通常飼料に10% (w/w) の割合で配合した。この配合飼料には約 $5 \times 10^6$  cfu/gの*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1が含まれている。次に、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株または*L. Bulgaricus* ATCC 33409株の添加飼料、対照として培地成分(脱脂粉乳)の添加飼料または通常飼料をそれぞれマウス[DBA/1JNCrj、雌、4週齢(日本チャールズリバー)]に2週間経口投与した。すなわち、*L. Bulgaricus* ATCC 33409株投与群、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株投与群、脱脂粉乳投与群、通常飼料投与群の4群に群分け(n=10)、投与期間中は各種飼料を自由摂取の形で実施した。摂取量は1日あたり約2g/head、菌数は*L. Bulgaricus* ATCC33409株、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株の両者とも約 $1 \times 10^7$  cfu/headであった。これらの飼料を投与後に各マウスをウシII型コラーゲン(bovine type II collagen; bCII)で免疫した。さらに、一次免疫後21日にbCIIで追加免疫を施した。以後、一次免疫後90日までCIAの発症を経時的に観察した。

【0028】CIA発症の評価を次により行った。すなわち、CIAの発症誘導後、各足について経時的にCIAの重篤度を評価した。評価を四段階で行い、その基準は以下の通りである。評価0：全く腫れていない状態。評価1：指が1本腫れている状態。評価2：指が2本腫れている、または甲が腫れている状態。評価3：足全体が非常に腫れている、または骨が変形している状態。

【0029】試験結果を以下に示す。マウス1匹あたりの関節炎指数の平均(図2)、CIAの発症したマウス手足の割合(図3)、およびCIAの発症したマウスの割合(図4)で評価した。すなわち、図2は1匹あたりの関節炎指数の平均値、つまり、関節炎の重篤度が*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株により軽減化されていることを示す。図3はマウスの足で評価した場合、関節炎の発症が*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株により抑制されていることを示す。図4はマウスで評価した場合、関節炎の発症率が*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株により抑制されていることを示す。

【0030】上記結果から明らかなように、いずれの評価においても*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株投与群は通常飼料投与群と比較して発症率と炎症重篤度の両者とも約1/5に減少し、明らかにCIA発症の抑制が認められた。以上の結果から、該乳酸菌*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1株の発酵物はCIAに対して著しい抑制および重篤度の軽減効果を有し、慢性関節リウマチだけではなく、潰瘍性大腸炎などの各種炎症疾患に対して有用な予防薬、あるいは治療薬となり得ることが認められた。

#### 【0031】

【実施例2】脱脂乳を80~85℃で20~30分間殺菌した後、ホモゲナイズし、冷却した。これにスターターとして本菌株(FERM P-17227)の純培養物を2~5%加え、35~85℃で1~3日間発酵させ、乳酸含量2%の酸乳を得た。

【0032】このようにして得た酸度2%の酸乳について、生じたカードを砕き、原料乳の0.8倍量の蔗糖を加えて攪拌した後、加温しながら蔗糖を同じく0.8倍量更に加えて攪拌し、混合物が半透明のシロップ状になった時点で温度を70~80℃に昇温し、熱時処理した後冷却し、香料を適量加えて、酸乳飲料(酸度1.2~1.3%)を得た。

#### 【0033】

【実施例3】ビタミンC40gまたはビタミンCとクエン酸の等量混合物40g、グラニュー糖100g、コーンスターチと乳糖の等量混合物60gに、本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物を40g加えて十分に混合した。混合物を袋に詰め、1袋1.5gのステック状栄養健康食品を150袋製造した。

#### 【0034】

【実施例4】次の配合により慢性関節リウマチ抑制剤を製造した。(1)本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物5g、(2)ラクトース90g、(3)コーンスターチ29g、(4)ステアリン酸マグネシウム1g。まず、(1)、(2)、(3)(但し17g)を混合し、(3)(但し7g)から調製したペーストとともに顆粒化した。得られた顆粒に(3)(但し5g)と(4)を加えてよく混合し、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分を40mg含有する錠剤100個を製造した。

#### 【0035】

【実施例5】次の配合を用意した。(1)本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物0.5g、(2)殺菌乳1L。(1)を(2)に無菌的に混合し、ビン詰めした。本発明においては、殺菌乳1Lあたり、(1)を0.01~10gを混合すればよい。

#### 【0036】

【発明の効果】本発明によれば、慢性関節リウマチ、潰

瘍性大腸炎等の自己免疫疾患の予防、軽減、治療が副作用を伴うことなく効率的に実施できる。本発明に係る組成物は、安全性には全く問題はなく、乳製品その他各種飲食品の形態に自由に調製することができるので、健常者はもとより、乳幼児、老令者、病弱者、病後の人等も長期間に亘って摂取することができ、特にすぐれた予防効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

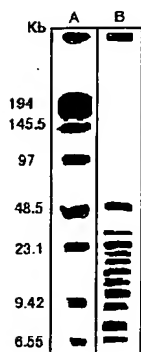
【図1】A p a I 処理した本菌株のパルスフィールド電気泳動パターンを示す。

【図2】マウス1匹あたりの関節炎指数の平均を示す。

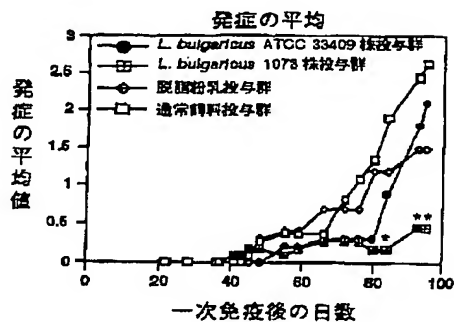
【図3】マウス手足C I A 発症率を示す。

【図4】C I A 発症マウスの割合を示す。

【図1】

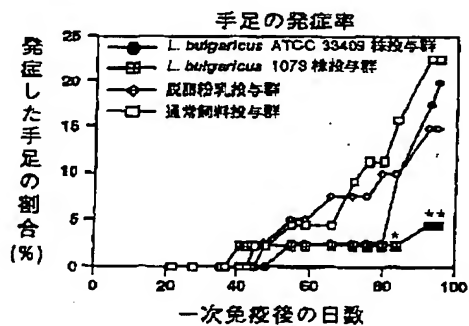


【図2】



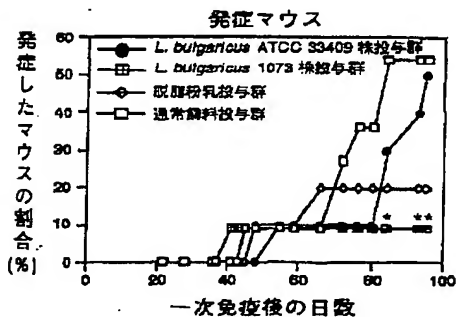
(★：通常飼料投与群に対して有意； $p<0.05$ , t-test)

【図3】



(★：通常飼料投与群に対して有意； $p<0.05$ ,  $\chi^2$ -test)

【図4】



(★：通常飼料投与群に対して有意； $p<0.05$ ,  $\chi^2$ -test)

フロントページの続き

(72)発明者 金子 勉  
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業  
株式会社中央研究所内  
(72)発明者 野田 勝彦  
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業  
株式会社中央研究所内

Fターム(参考) 4B018 LB07 LB08 LB10 LE01 LE02  
LE03 LE04 MD33 MD86 ME14  
MF06 MF13  
4B065-AA30X AC14 BB24 BC03  
BC13 BD11 CA14 CA22 CA42  
CA44  
4C087 AA01 AA02 BC56 CA09 CA10  
CA14 CA43 MA01 MA11 MA28  
MA34 MA44 MA52 NA14 ZA66  
ZA68 ZB05 ZB08 ZB15

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-247895

(43)Date of publication of application : 12.09.2000

---

(51)Int.Cl. A61K 35/74

A23L 1/30

A61P 29/00

A61P 37/02

C12N 1/20

---

(21)Application number : 11-047532 (71)Applicant : MEIJI MILK PROD  
CO LTD

(22)Date of filing : 25.02.1999 (72)Inventor : ITO HISATOSHI  
UEMURA JUNKO  
KANO HIROSHI  
KANEKO TSUTOMU  
NODA KATSUHIKO

---

## (54) AUTOIMMUNE DISEASE PREVENTIVE COMPOSITION

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject autoimmune disease preventive composition that has the preventive effect against autoimmune diseases, for example, rheumatoid arthritis by using a specific phosphorus-containing polysaccharide-producing lactobacillus, a material containing the lactobacillus cell bodies and its treated product as an active ingredient.

**SOLUTION:** This autoimmune disease preventive composition includes, as an active ingredient, (A) at least one selected from lactobacillus capable of producing phosphorus-containing polysaccharide mainly constituted with galactose and glucose, preferably *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* OLL 1073R-1 (FERM P-17227), (B) a material containing the above-stated

lactobacillus selected from lactobacillus cell body suspension, a lactobacillus culture mixture, the milk that is fermented with the lactobacillus, and (C) the processed product thereof, for example, a concentrate therefrom, paste, dried product (by spray-drying, freeze-drying, vacuum-drying or drum-drying) and their dilution product. The dose of the active ingredient is usually 0.0001–10 wt.% in a preferred embodiment.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.04.1999

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3017493

[Date of registration] 24.12.1999

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office



\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The autoimmune disease prevention constituent characterized by coming to contain at least one of the lactic acid bacteria and this lactic-acid-bacteria inclusion which have the polysaccharide productivity which has an autoimmune disease prevention operation, and uses a galactose and a glucose as configuration sugar, and contains Lynn, and the processing object of its.

[Claim 2] Lactic acid bacteria are *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) OLL1073. Constituent according to claim 1 characterized by being R-1.

[Claim 3] The constituent according to claim 1 or 2 characterized by a lactic-acid-bacteria inclusion being at least one chosen from lactic-acid-bacteria suspension, a lactic-acid-bacteria culture, lactic-acid-bacteria culture medium, and lactic-acid-bacteria fermented milk.

[Claim 4] A constituent given in any 1 term of claims 1-3 to which a processing object is characterized by being at least one chosen from a concentrate, a pasting object, a dry matter (at least one chosen from a spray drying object, a freeze-drying object, a vacuum-drying object, and a drum dry matter), and dilution.

[Claim 5] A constituent given in any 1 term of claims 1-4 characterized by a constituent being an eating-and-drinking article type or drugs type constituent.

[Claim 6] *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 (FERM P-17227).

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

**[0001]**

**[Field of the Invention]** This invention relates to the constituent containing the lactic acid bacteria and these lactic acid bacteria which have an autoimmune disease preventive effect.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** Immunocyte has played the central role in biophylaxis. However, the disease which considers the breakdown of the control in an immune system as a cause is increasing remarkably so that it may see by allergy, an autoimmune disease, etc. in recent years. Allergy is a disease produced in order that the immunocyte by the side of a living body may originally answer superfluously to a harmless antigen for a living body. An autoimmune disease is a disease produced in order that immunocyte may answer a living body's own organization, own component, etc. although there is symptomatic therapy also in any about the disease with which an autoimmune disease is known as autoimmune diseases, such as ulcerative colitis and a part of rheumatoid arthritis, since the autoimmunity response is participating in the onset and chronic -- a prophylaxis -- of course -- Kanji -- law is not yet established.

**[0003]** As above-mentioned, the breakdown of the control in an immune system is participating in chronic of an autoimmune disease greatly, and the T cell which produces the cytokine of Th1 mold especially is involving. In a living body immune system, 1 mold helper T cell (Th1) and 2 mold helper T cell (Th2) exist in a helper T cell. Among these, Th1 cell produces IL-2 and IFN-gamma, guides production of IgG2a, and raises a delayed hypersensitivity reaction. To it, Th2 cell produces IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10, and guides production of IgE and IgG1. These produced cytokine acts each other mutually, and adjusts immunity and an allergic response. Although balance of Th1 and Th2 is maintained in healthy the living body, when allergy is caused,

Th2 is superior, and it is known that Th1 serves as dominance by the autoimmune disease at reverse.

[0004] Also in the rheumatoid arthritis which is a kind of an autoimmune disease, the intervention of the cytokine of Th1 type is suggested and control of arthritis or relief-ization is checked by prescribing for the patient IL-4 which are a kind of neutralization or Th2 cytokine about IFN-gamma which is one of the Th1 cytokine in an animal experiment model. However, in order that the immune response of Th1 type may play an important role in abatement of various disease germs and a neoplasm, the shift to superfluous Th2 not only causes allergy, but is connected to the infection by the disease germ or the virus, and the lowering of resistance to a neoplasm. Moreover, the burden to the autoimmune disease patient who the cytokine of Th2 type and administration of an immunosuppressant have a problem also not only in respect of the side effect but in respect of cost, and needs a prolonged medical treatment in many cases is large. then, side effects, such as a shift to Th2 response extreme to the therapy and prevention of rheumatoid arthritis, -- there is nothing -- in addition -- and development of the chemical or food which can be taken in daily is called for.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] this invention since it is above -- as preventive measures, such as rheumatoid arthritis, -- cheap -- everyday -- intake -- possible -- in addition -- and it aims at offer of the food which does not have the evil by superfluous control of Th1 response safely that is, or drugs.

[0006]

[Means for Solving the Problem] This invention was made in order to solve the above-mentioned trouble, and as a result of taking lessons from the depressor effect of the lactic acid bacteria to the animal experiment model (Collagen-Induced Arthritis;CIA) of rheumatoid arthritis and piling up research wholeheartedly, it found out *Lactobacillus delbrueckii* subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 which has polysaccharide production ability among lactic acid bacteria. the onset of CIA controls by administering the fermentation object of this bacillus orally to a mouse -- having -- in addition -- and the important knowledge that whenever [ the / critical ] was relief-ized when symptoms develop was acquired. Moreover, it is expected that this bacillus has the depressor effect over other inflammatory diseases, such as ulcerative colitis, besides rheumatoid arthritis. The mycology-property of *Lactobacillus delbrueckii* subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 is as follows.

[0007] A. gestalt-description -- form [ of a cell ]: -- Bacillus maneuverability: -- existence [ of a nothing spore ]: -- nothing Gram's stain nature: -- a positivity -- [0008] B. This strain is applied on the growth

condition BL agar-medium (EIKEN CHEMICAL) plate on a culture medium, 37 degrees C is cultivated with a steel-wool method for 48 hours, and the gestalt of an opaque rough form colony is shown.

[0009] C. physiological -- description -- nitrate's reduction: -- electronegative Indore generation: -- electronegative gelatin liquefaction: -- electronegative catalase: -- attitude: to electronegative oxygen -- a denominator -- BL liquid medium which generates D (-) lactic acid by homolactic fermentation, and does not produce gas from an anaerobic glucose -- growth at 10 degrees C -- growth at negative and 45 degrees C -- the resolvability (electropositive +, electronegative -) of the aerosis:negative various carbohydrates from an electropositive arginine resolvability:negative malic acid

Arabinose - A xylose - Rhamnose - A ribose - A glucose + A mannose + A fructose + A galactose - Shoe cloth - A maltose - A cellobiose - A lactose + Trehalose - A melibiose - Raffinose-melezitose -dextrin - starch - glycogen - inulin - mannitol - sorbitol - inositol-esculin - salicin -[0010] D. genetic -- property Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 -- Tannock's and others approach (Microbial.Ecol.Health Dis.8:79-84 (1995) --) It applies to Appl.Environ.Microbiol.62:4608-4613 (1996) correspondingly. The biomass was fixed to the agarose plug after culture, and after the bacteriolysis, when the restriction enzyme (ApaI) decomposed genomic DNA and pulse field electrophoresis was performed, the band pattern of drawing 1 was shown. the inside of drawing, and A -- a size marker and B -- Lactobacillus delbrueckii subsp. -- bulgaricus OLL 1073 R-1 is shown.

[0011] E. Polysaccharide productivity Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 (it may be hereafter called a bacteria stock) has polysaccharide productivity, and it has the description of producing the polysaccharide which uses a galactose and a glucose as configuration sugar and contains Lynn out of a cell.

[0012] That is, about culture 1L after 37 degrees C incubates by the skim milk-powder culture medium 10% for 24 hours, the bacteria stock was freeze-dried, ethanol precipitation, nuclease, and after carrying out proteinase processing, and 58.4mg of polysaccharide was obtained. this polysaccharide -- DEAE-TOYOPEARL two fractions, the neutral polysaccharide (NPS) which performs ion-exchange-resin processing using 650M, and does not stick to resin, and the acid polysaccharide (APS) which sticks to resin, -- respectively -- 4.26 mg/l -- and it obtained 2.18 mg/l.

[0013] the molecular weight of polysaccharide -- NPS --  $1.2 \times 10^6$  -- Da and APS were presumed to be  $1.1 \times 10^6$ Da(s). Moreover, as a result of the sugar composition analysis by pyridylamino-izing, the ratio of a galactose (Gal) and a glucose (Glc) is 1.3:1.0, and, as for rhamnose, NPS and APS were not contained. Lynn was not included in NPS after perchloric acid hydrolysis to

APS having contained Lynn 0.1%, as for the content of Lynn by the assay of Lynn using an ammonium molybdate. These analysis results are shown in a table 1.

[0014]

(Table 1: Sugar and content of Lynn)

----- A content (%) A mole ratio All  
 carbohydrates Li N Glc Gal ----- NPS 68.1 0.0  
 1.0 1.3 APS 73.6 0.1 1.0 1.3----- [0015] NPS

was what consists of five saccharides which have the repetition unit of 3Gal and 2Glc(s) as a result of analysis by methylation. The result is shown in a table 2. In addition, 2, 3, 4, and 6-Tetra-O-Me-Gal was set to 1.0.

[0016]

(表2 : N P S のメチル化分析)

	モル比
2, 3, 4, 6-Tetra-O-Me-Gal	1.0
2, 3, 6-Tri-O-Me-Gal	0.7
3, 4, 6-Tri-O-Me-Glc	0.8
2, 4, 6-Tri-O-Me-Glc	1.3
2, 6-Di-O-Me-Gal	0.9

[0017] A bacteria stock is Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus, in view of a general mycology-property. Although it accepts as what belongs The point of having polysaccharide productivity especially, the point that Lynn is included in the polysaccharide, Moreover in the point of an autoimmune disease prevention operation of making it new and having useful bioactive, are characteristic. In view of such strain not having the example reported in the past, a bacteria stock is accepted to be new strain. This is named Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 and it is FERM to National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology. It \*\*\*\*\*ed as P-17227.

[0018] These lactic acid bacteria reduce the onset of CIA so that clearly also from the example which carries out a postscript. And when symptoms develop, it is checked that whenever [ that / critical ] is relief-ized, and this invention is completed based on this useful new knowledge. in addition -- this invention It has an autoimmune disease prevention operation and is related with the autoimmune disease prevention constituent characterized by coming to contain at least one of the lactic acid bacteria and this lactic-acid-bacteria inclusion which have Gal, Glc, and the Lynn content

polysaccharide productivity, and the processing object of its.

[0019] Lactic-acid-bacteria culture medium which removed solid content from the lactic-acid-bacteria suspension; lactic-acid-bacteria culture (biomass, culture supernatant liquid, and culture-medium component are included); lactic-acid-bacteria culture as a lactic-acid-bacteria inclusion; lactic-acid-bacteria fermented milk; which consists of eating-and-drinking articles which carried out lactic-acid-bacteria fermentation, such as a lactic acid bacteria beverage, sour milk, and yogurt, is mentioned.

[0020] As a processing object, lactic acid bacteria, a lactic-acid-bacteria inclusion, the concentrate of fermented milk, a pasting object, dry matters (a spray drying object, a freeze-drying object, a vacuum-drying object, drum dry matter, etc.), dilution, etc. are mentioned. Moreover, as lactic acid bacteria, a viable cell object, humid bacillus, and desiccation bacillus, a killed bacteria object, biomass debris, etc. are usable suitably.

[0021] The constituent concerning this invention comes to contain at least one of lactic acid bacteria, an inclusion, and the processing objects as an active principle, and it can be freely used for it also as a constituent of which an eating-and-drinking article type and drugs type type.

[0022] Although the loadings of an active principle may be arbitrary, 0.0001 – 10% of range is [ that what is necessary is just to set suitably according to the purpose of use (prevention, health, or therapy), a patient's age, a medication method, dosage forms, etc. ] usually suitable. However, in continuing at a long period of time and taking in for a health top thru/or the object of healthy maintenance, it may be more nearly little than the above-mentioned range, and since this active principle is satisfactory about safety, even if it uses it so much more than the above-mentioned range, it does not interfere at all. The example of death was not actually accepted by internal use of 1000 mg/kg as a result of the acute toxicity test for ten days using a mouse, either.

[0023] When using it as an eating-and-drinking article type constituent, as it is, this active principle can be used, or is used together with other food thru/or a food constituent, and can be suitably used according to a conventional method. If the constituent concerning this invention using this active principle is pharmaceutical-preparation-ized to a nutritional drink using the shape of the shape of a solid-state (powder, granularity, others), and a paste, and the various liquefied components regularly used by sweeteners, an acidulant, and other vitamin compound and drinkable-preparations manufacture although may be, it may carry out and any of the letter of suspension are sufficient, it is suitable.

[0024] When using it as a drugs type constituent, this active principle is prescribed for the patient with various gestalten. As the administration gestalt, internal use by a tablet, the capsule, the granule, powder, syrups, etc.

can be raised. These various pharmaceutical preparation can be pharmaceutical-preparation-ized using the known adjuvant which can usually be used for a chief remedy in medicinal pharmaceutical preparation technical fields, such as an excipient, a binder, disintegrator, lubricant, correctives, a solubilizing agent, suspension, and a coating agent, according to a conventional method. Although the amount used changes with a symptom, age, weight, a medication method, dosage forms, etc., to an adult, per day and in vein administration, per weight of 1kg and biomass  $1 \times 10^3$ – $1 \times 10^7$ cfu can be prescribed for the patient, and when it is muscular administration,  $1 \times 10^4$ – $1 \times 10^8$ cfu can usually be prescribed for the patient. Moreover, although what is necessary is just to carry out  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^{12}$ cfu extent administration in internal use, since bacteria is originally used as edible; it is satisfactory at safety, and high-concentration administration is also more possible than the above-mentioned range.

[0025] these lactic acid bacteria reduce the rate of the onset of CIA -- making -- in addition -- and when symptoms develop, whenever [ the / critical ] is relief-ized. Next, although an example is given and being explained to a detail about utilization to the fermented milk of this strain, this invention is not limited to this. For example, in case the fermented milk using *Lactobacillus delbrueckii* subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 share is manufactured How to use as a mixed starter of the approach, this strain and this strain which use this strain as an independent starter, and the *Streptococcus thermophilus* stock which has a symbiosis operation, Or the approach of using as other lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) or a mixed starter with *Bifidobacterium* can be enforced.

[0026] The constituent concerning this invention can be used as a drugs type and eating-and-drinking article type constituent as mentioned above, can be prepared especially in the latter in gestalten, such as fermented milk, sour milk, a lactic acid bacteria beverage, and yogurt, and can prevent, mitigate and treat rheumatoid arthritis and others various kinds of reasonable autoimmune diseases to inside free from not knowing by taking in this (\*\*) daily. And since this constituent does not have a problem in safety, either, it can take in for a long period of time, without being accompanied by the harmful side effect, and it is very suitable for prevention of an autoimmune disease, and can be called the outstanding food for specified health use. Hereafter, the example of this invention is described.

[0027]

[Example 1] Freeze-drying processing of the culture medium obtained after about 18-hour culture by the skimmilk-powder culture medium 10% (w/w) in the *Lactobacillus delbrueckii* subsp.bulgaricus OLL 1073 R-1 share was carried out. The freeze-drying powder obtained by this processing was blended with mouse usual feed at 10% (w/w) of a rate. *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 of abbreviation  $5 \times 10^6$  cfu/g is contained in this mixed feed. Next, the addition feed or usual feed of a culture-medium component (skimmilk powder) was administered orally to the mouse [DBA/1JNCrj, a female, and 4 weeks old (Charles River Japan)] for two weeks, respectively as Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 share or the addition feed of 33409 shares of L. Bulgaricus ATCC, and contrast. That is, various feed was carried out in the form of free intake during the group part opium poppy ( $n = 10$ ) and the administration period in 4 of a 33409 shares of L. Bulgaricus ATCC administration group, a Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1-share administration group, a skimmilk-powder administration group, and a usual feed administration group groups. Per day, intake was about 2 g/head and 33409 shares of L. Bulgaricus ATCC and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 share both of number of microorganism were abbreviation  $1 \times 10^7$  cfu/head. After prescribing these feed for the patient, immunity of each mouse was carried out by the cow II mold collagen (bovine type II collagen; bCII). Furthermore, the booster was given by bCII on the 21st after primary immunity. Henceforth, the onset of CIA was observed with time till after [ primary immunity ] the 90th.

[0028] The degree estimated the CIA onset. That is, whenever [ of CIA / critical ] was evaluated with time about each guide peg after onset induction of CIA. Evaluating, the criteria are as follows in four steps. Assessment 0: The condition which is not swollen at all. Assessment 1: The condition whose one finger is swollen. Assessment 2: The condition whose shell whose two fingers are swollen or is swollen. Assessment 3: The condition which whose whole guide peg was dramatically swollen, or is deforming the bone.

[0029] A test result is shown below. The average ( drawing 2 ) of the arthritis characteristic per mouse, the rate ( drawing 3 ) of the mouse hand and foot whose symptoms CIA showed, and the rate ( drawing 4 ) of the mouse whose symptoms CIA showed estimated. That is, drawing 2 shows that whenever [ of the average of the arthritis characteristic per animal, i.e., arthritis, / critical ] is relief-ized by the Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073R-1 share. Drawing 3 shows that the onset of arthritis is controlled by the Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 share, when the guide peg of a mouse estimates. Drawing 4 shows that the rate of the onset of arthritis is controlled by the Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 share, when it evaluates with a mouse.

[0030] Also in assessment [ which ], as compared with the feed administration group, both whenever rate of the onset and inflammation critical decreased in number to 5 by about  $1/$ , and, as for the Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1-share administration group, control of the CIA onset was usually clearly accepted so that clearly from



the above-mentioned result. from the above result -- this -- a lactic-acid-bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 share fermentation object has remarkable control and the relief effectiveness whenever critical to CIA, and it was admitted that it could become useful preventive or a remedy to various inflammation diseases, such as not only rheumatoid arthritis but ulcerative colitis.

[0031]

[Example 2] It homogenized and cooled, after sterilizing a skimmilk for 20 - 30 minutes at 80-85 degrees C. Added the culture pure object of a bacteria stock (FERM P-17227) to this 2 to 5% as a starter, it was made to ferment for one - three days at 35-85 degrees C, and sour milk of 2% of lactic-acid contents was obtained.

[0032] Thus, the produced card was broken about sour milk of 2% of obtained acidity, the amount of 0.8 times and also when it stirred in addition and mixture became the shape of translucent syrup, after carrying out temperature up of the temperature to 70-80 degrees C and filtering sucrose similarly at the time of heat, warming after adding the sucrose of the amount of 0.8 times of raw material milk and stirring, it cooled, and optimum dose, in addition a sour milk drink (1.2 - 1.3% of acidity) were obtained for perfume.

[0033]

[Example 3] 40g of freeze-drying objects of the culture in the skimmilk-powder culture medium of a bacteria stock was added to 60g of equivalent mixture of 40g of vitamin C, vitamin C, 40g of equivalent mixture of a citric acid, 100g of granulated sugar and corn starch, and a lactose, and it fully mixed. Mixture was put in the bag and 150 bags of 1.5g one-bag stick-like nutrition health food was manufactured.

[0034]

[Example 4] The rheumatoid arthritis inhibitor was manufactured by the next combination. (1) 5g [ of freeze-drying objects of the culture in the skimmilk-powder culture medium of a bacteria stock ], and (2) lactose 90g, (3) corn-starch 29g, 1g of (4) magnesium stearates. First, (1), (2), and (3) (however, 17g) were mixed, and it granulated with the paste prepared from (3) (however, 7g). (3) (however, 5g) and (4) could be added to the obtained granulation, it mixed, this mixture was compressed with the compressed tablet machine, and 100 tablets which contain 40mg of active principles per one lock were manufactured.

[0035]

[Example 5] The next combination was prepared. (1) 0.5g of freeze-drying objects of the culture in the skimmilk-powder culture medium of a bacteria stock, (2) pasteurized-milk 1L. It mixed to (2) in sterile and bottling of (1) was carried out to it. What is necessary is just to mix 0.01-10g for per [ pasteurized milk 1L ] and (1) in this invention.

[0036]

[Effect of the Invention] According to this invention, it can carry out efficiently, without accompanying prevention of autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis and ulcerative colitis, relief, and a therapy by the side effect. Since a problem does not have a constituent concerning this invention in safety and it can be freely prepared in the gestalt of eating-and-drinking articles dairy products and various [ other ], not only a healthy person but also the man after infants, an old \*\* person, the invalid, and the illness etc. can continue at a long period of time, and it can be taken in, and does the especially excellent preventive effect so.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The pulse field electrophoretic pattern of the bacteria stock which carried out ApaI processing is shown.

[Drawing 2] The average of the arthritis characteristic per mouse is shown.

[Drawing 3] The rate of the mouse hand-and-foot CIA onset is shown.

[Drawing 4] The rate of a CIA onset mouse is shown.

---

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant:

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**